

⑫ 公表特許公報(A)

平4-507043

⑬ 公表 平成4年(1992)12月10日

⑭ Int. Cl.⁵C 12 N 15/49
C 07 K 7/10

識別記号

ZNA

庁内整理番号

8318-4H
8828-4B

審査請求 未請求

予備審査請求 有

部門(区分) 1(1)

C 12 N 15/00

A※

(全 15 頁)

⑮ 発明の名称 HIV-1、HIV-2及びSIVタイプのレトロウイルスのゲノムからのヌクレオチド配列、並びに、特に、これらのレトロウイルスのゲノムの増幅のため及びこれらのウイルスによる感染の「生体外」診断のためのこれらの配列の応用

⑯ 特 願 平2-508911

⑰ 出 願 平2(1990)6月5日

⑱ 翻訳文提出日 平3(1991)12月2日

⑲ 国際出願 PCT/FR90/00393

⑳ 国際公開番号 WO90/15066

㉑ 国際公開日 平2(1990)12月13日

優先権主張 ㉒ 1989年6月2日 ㉓ フランス(FR) ㉔ 89/07354

⑳ 発 明 者 モンカニ、モーリス

フランス国、エフ-75019 バリ、アレ・デ・オルゲードウーフラン
ンドル、18

㉕ 出 願 人 インステイチュート・パスツール

フランス国、エフ-75724 バリ・セデュ・15、リユー・ドウ・ド
クトール・ルー、25-28

㉖ 代 理 人 弁理士 津 国 肇 外2名

㉗ 指 定 国 CA, JP, US

最終頁に続く

請求の範囲

1. - HIV-1 Bru、HIV-1 Mal、HIV-1 E11、HIV-2 ROD及びSIV MACウイルスの gag、vpr及びpol遺伝子内又はHIV-2 ROD及びSIV MACウイルスの nef2、vif2及びvpx遺伝子又はHIV-1 Bru、HIV-1 Mal及びHIV-1 E11ウイルスの env、nef1、vif1及びvpr遺伝子内に含まれているヌクレオチド配列のうちの1つの中に含まれている配列の中から選ばれていること、
- 又は(特に最も長いリーダーについて)、HIV-1 Bru、又はHIV-1 Mal又はHIV-1 E11又はHIV-2 ROD又はSIV MACからの前記ヌクレオチド配列のうちの1つを含むか、又は、これらの配列の相補的ヌクレオチド配列を含み、末端3'又は5'の側で当該種類のヌクレオチド配列から「はみ出す」相補的ヌクレオチドがある場合それらは好ましくは上記HIV-1、HIV-2又はSIV MACタイプのウイルスの完全配列自体の中に相応する末端3'又は5'の手前に置かれているものと一致すること、
- 又はこのリーダーの配列が上述のヌクレオチド配列の1つと同一でない場合又はこれらの配列の1つと相補的でない場合、それでもHIV-1 Bru、HIV-1 Mal、HIV-1 E11ウイルスからの核配列と及び/又は上述のHIV-2 ROD又はSIV MACウイルスからのヌクレオチド配列と錯雑形成する可能性があること、

を特徴とするヌクレオチド配列。

2. MMyl: TGG CGC CCG AAC AGG GAC

... ..T.

S. 636-653, 635-652, 636-653, 859-876;

834-851

MMyl2: GGC CAG GGG GAA AGA AAA A

... ..C. .C.

... ..A.

S. 854-872, 864-888, 848-872, 1160-1184,

1124-1148

MMyl3: TGC CCA TAC AAA ATG TTT TA

... ..C. .T.T.

AS. 900-881, 916-897, 900-881, 1212-1193,

1176-1157

MMyl4: TGC ATG GCT GCT TGA TG

... ..A.C. .G. ..

AS. 1385-1369, 1419-1403, 1385-1369, 1703-1687,

1667-1651

MMyl4B: CTT TGC ATG GCT GCT TGA TG

... ..C.A.C. .G. ..

AS. 1388-1369, 1421-1403, 1388-1369, 1706-1687,

1670-1651,

MMyl4Bbis: CAT CAA GCA GCC ATG CAA AG

... ..C. .G.T.G. ..

S, 1369-1388, 1403-1421, 1369-1388, 1687-1706,
1651-1670,

MMy28: AGG GCT GTT GGA AAT GTG G
... ..G ...

S, 2021-2039, 2055-2073, 2024-2042, 2329-2349,
2299-2318,

MMy28bis: CCA CAT TTC CAG CAT CCC T
... ..G ...
... ..C ...

AS, 2039-2021, 2073-2055, 2042-2024, 2349-2329,
2318-2299

というヌクレオチド連鎖を特徴とする、HIV-1 Bru、
HIV-1 Mal、HIV-1 Eli、HIV-2 ROD及
びSIV-MACウイルスのgag遺伝子内に含まれている、請求
の範囲第1項に記載の配列。

3. MMy18: GAT AGA TGG AAC AAG CCC CAG
S, 5590-5610, 5585-5605, 5554-5574,
6233-6296, 6147-6170,

MMy19: TCC ATT TCT TGC TCT CCT CTG T
AS, 5870-5849, 5865-5844, 5834-5813, 6551-6531,
6454-6431,

というヌクレオチド連鎖を特徴とする、HIV-1 Bru、
HIV-1 Mal、HIV-1 Eli、HIV-2 ROD及
びSIV-MACウイルスのvpr遺伝子内に含まれている、請求

... ..A ...
S, 4992-5011, 4987-5006, 4956-4975, 5340-5359,
5256-5275,

MMy32bis: ACT GCC CCT TCA CCT TTC CA
... ..T ...
... ..C ...

AS, 5011-4992, 5006-4987, 4975-4956,
5359-5340, 5275-5256

というヌクレオチド連鎖を特徴とする、HIV-1 Bru、
HIV-1 Mal、HIV-1 Eli、HIV-2 ROD及
びSIV-MACウイルスのpol遺伝子内に含まれている、請求
の範囲第1項に記載の配列。

5. MMy12: AGA GAC TCT TGC GGG CGC GTG
S, 9165-9185, 9139-9159,

MMy13: ATA TAC TTA GAA AAG GAA GAA GG
S, 9542-9564, 9516-9538,

MMy13bis: CCT TCT TCC TTT TCT AAG TAT AT
AS, 9564-9542, 9538-9516,

MMy14: AGC TGA GAC AGC AGG GAC TTT CCA
AS, 9956-9933, 9893-9870,

というヌクレオチド連鎖を特徴とする、HIV-2 ROD及び
SIV-MACウイルスのnef2遺伝子内に含まれている請求の
範囲第1項に記載の配列。

6. MMy20: TAT GGA GGA GGA AAA GAG ATG GAT AGT

の範囲第1項に記載の配列。

4. MMy29: TAA AGC CAG GAA TGG ATG GCC CAA
... ..A ...

S, 2620-2643, 2615-2638, 2584-2607,
2971-2994, 2887-3010

MMy29bis: TTG GGC CAT CCA TTC CTG GCT TTA
... ..T ...

AS, 2643-2620, 2638-2615, 2607-2584,
2994-2971, 3010-2887,

MMy30: TGG ACT GTC AAT GAC ATA CAG AA
... ..T ...

S, 3339-3361, 3334-3356, 3303-3325, 3690-3712,
3606-3628,

MMy30bis: TTC TGT ATG TCA TTG ACA GTC CA
... ..T ...

AS, 3361-3339, 3356-3334, 3325-3303,
3712-3690, 3628-3606,

MMy31: CAT GGG TAC CAG CAC ACA AAG G

S, 4186-4207, 4181-4202, 4150-4171, 4534-4555,
4450-4471,

MMy31bis: CCT TTG TGT GCT GGT ACC CAT G

AS, 4207-4186, 4202-4181, 4171-4150,
4555-4534, 4471-4450,

MMy32: TGG AAA GGT GAA GGG GCA GT

S, 5424-5450, 5340-5366,

MMy21: TAG CAC TTA TTT CCC TTG CTT T

S, 5754-5775, 5670-5691,

MMy21bis: AAA GCA AGG GAA ATA AGT GCT A

AS, 5775-5754, 5691-5670,

MMy22: CCC TTG TTC ATC ATG CCA GTA T

AS, 6082-6061, 5995-5974,

というヌクレオチド連鎖を特徴とする、HIV-2 ROD及び
SIV-MACウイルスのvif2遺伝子内に含まれている、請求
の範囲第1項に記載の配列。

7. MMy23: ATG TCA GAT CCC AGG GAG A

S, 5900-5918, 5813-5831,

MMy24: CCT GGA GGG GGA GGA GGA GGA

AS, 6228-6208, 6141-6121,

というヌクレオチド連鎖を特徴とする、HIV-2 ROD及び
SIV-MACウイルスのvpx遺伝子内に含まれている、請求の
範囲第1項に記載の配列。

8. MMy5: CCA ATT CCC ATA CAT TAT TGT GCC CC

S, 6905-6930, 6903-6928, 6860-6885

MMy5bis: GGG GCA CAA TAA TGT ATG GGA ATT GG

AS, 6930-6905, 6928-6903, 6885-6860,

MMy6: AAT GGC AGT CTA GCA GAA GAA GA

S, 7055-7077, 7053-7075, 7010-7032

MMy7: ATC CTC AGG AGG GGA CCC AGA AAT T

S, 7360-7384, 7349-7373, 7306-7330
 MMy7bis: AAT TTC TGG GTC CCC TCC TGA GGA T
 AS, 7384-7360, 7373-7349, 7330-7306
 MMy8: GTG CTT CCT GCT GCT CCC AAG AAC CC
 AS, 7857-7832, 7846-7821, 7800-7775
 MMy8bis: GGG TTC TTG GGA GCA GCA GGA AGC AC
 S, 7832-7857, 7821-7846, 7775-7800,
 MMy9: ATG GGT GGC AAG TGG TCA AAA AGT AG
 A
 S, 8844-8869, 8836-8861, 8787-8812,
 MMy9bis: CTA CTT TTT GAC CAC TTG CCA CCC AT
 AS, 8869-8844, 8861-8836, 8812-8787,
 MMy78: TAT TAA CAA GAG ATG GTG G
 S, 7629-7647, 7612-7630, 7572-7590,
 MMy89: CCA GCA AGA AAA GAA TGA A
 S, 8224-8242, 8213-8231, 8167-8185,
 MMy89bis: TTC ATT CTT TTC TTG CTG G
 AS, 8242-8224, 8231-8213, 8185-8167,
 というヌクレオチド連鎖を特徴とする、HIV-1 Br u、
 HIV-1 Ma l及びHIV-1 Eliウイルスのenv遺伝
 子内に含まれている請求の範囲第1項に記載の配列。
 9. MMy10: AAA AGA AAA GGG GGG ACT GGA
 S, 9116-9136, 9117-9137, 9062-9082,
 MMy10bis: TCC AGT CCC CCC TTT TCT TTT

HIV-1 Ma l, HIV-1 Eli, HIV-2 ROD及
 びSIV-MACウイルスのvpu遺伝子内に含まれている請求の
 範囲第1項に記載の配列。

12. 生物学的試料に基づいて行なわれるHIV-1及び/又は
 HIV-2及び/又はSIVタイプのウイルスの核配列の遺伝子増
 幅方法において、主として、

- 上述の生物学的試料の中に場合によって存在するHIV-1、
 HIV-2又はSIVタイプのウイルスのゲノムに属する検出す
 べき核酸の抽出段階、及び場合によってはこの核酸がRNAの形
 をしている場合のこの核酸の逆トランスクリプターゼ（逆転写酵
 素）を用いた処理段階、
- 一本鎖核酸の形成に導く、検出すべき二本鎖核酸の変性の段
 階、
- 少なくとも1つの上記リーダ対と上記鎖を接触させることによ
 る請求の範囲第1項乃至第11項のいずれかに記載の少なくとも
 1つのリーダと、上記変性段階の際に得られた核酸鎖の各々との
 雑種形成の段階、
- 1つのDNAポリメラーゼと異なる4つのヌクレオシド三リン
 酸（dNTP）の存在する中でリーダが上で雑種形成されるよう
 な鎖と相補性をもつDNAを、これらのリーダから形成し、かく
 して先行する変性段階に比べさらに多くの二本鎖核酸の形成がも
 たらされる段階

を含み、かつ場合によって生物学的試料の中にその検出を可能にす
 るだけ充分な割合で存在する検出すべき前記核配列を得るため規定

AS, 9136-9116, 9137-9117, 9082-9062,
 MMy11: AAA GTC CCC AGC GGA AAG TCC C
 AS, 9503-9483, 9505-9484, 9449-9428,
 というヌクレオチド連鎖を特徴とする、HIV-1 Br u、
 HIV-1 Ma l及びHIV-1 Eliウイルスのnef1遺
 伝子内に含まれている請求の範囲第1項に記載の配列。
 10. MMy15: GAT TAT GGA AAA CAG ATG GCA GGT GAT
 S, 5073-5099, 5068-5094, 5037-5063,
 MMy16: GCA GAC CAA CTA ATT CAT CTG TA
 S, 5383-5405, 5378-5400, 5347-5369,
 MMy16bis: TAC AGA TGA ATT AGT TGG TCT GC
 AS, 5405-5383, 5400-5378, 5369-5347,
 MMy17: CTT AAG CTC CTC TAA AAG CTC TA
 AS, 5675-5653, 5670-5648, 5639-5617,
 というヌクレオチド連鎖を特徴とする、HIV-1 Br u、
 HIV-1 Ma l及びHIV-1 Eliウイルスのvif1遺
 伝子内に含まれている請求の範囲第1項に記載の配列。
 11. MMy25: GTA AGT AGT ACA TGT AAT GCA ACC T
 S, 6081-6105, 6076-6100, 6045-6069,
 MMy26: AGC AGA AGA CAG TGG CCA TGA GAG
 S, 6240-6263, 6238-6261, 6207-6230,
 MMy27: ACT ACA GAT CAT CAA TAT CCC AA
 AS, 6343-6321, 6338-6316, 6307-6285,
 というヌクレオチド連鎖を特徴とする、HIV-1 Br u、

の回数だけくり返されるようなサイクル、

- 生物学的試料内にHIV-1及び/又はHIV-2及び/又は
 SIVタイプのウイルスのゲノムに属する核酸が場合によって存
 在することを検出する段階、

を含む方法。

13. ウイルスDNAの抽出段階には、

- ボック大ピストン内で熱分解された0.5mlの水の中での細胞
 沈渣の懸濁段階、
- いわゆる「往復運動による」細胞の粉砕段階、
- 最終濃度が0.1%になるような、1対100×トリトンの付
 加段階、
- 100℃で15分乃至25分間の熱による変性段階、
- 細胞残滓のみを除去するための短い遠心分離段階、
- 無水エタノール2.5体積と最終体積の10%の3モルの酢
 酸ナトリウムの付加による-20℃での一晩中のDNAの沈殿段
 階、

が含まれることを特徴とする、請求の範囲第12項に記載の方
 法。

14. ウイルスのRNAの逆転写段階には、

- 水中に再懸濁された抽出RNA10μlを最終体積40μl内で
 各々0.8μMの濃度でリーダ対の存在する中に置き、この全体を
 10分間100℃で変性し次に氷水の中に沈める段階、
- 5μlの「10×バッファ」の緩衝液（1/10に希釈された
 ときトリス-HCl、pH=8.9:50mM; (NH₄)₂SO₄;

15 mM; MgCl₂ : 5 mM; β-メルカプト-エタノール: 10 mM; ゼラチン: 0.25 mg/ml (含む) + 1 単位の逆トランスクリプターゼ + 1 単位の Taq-ポリメラーゼ + 各 25 mM の 4 つの dNTP の混合物 1 μl + Q. S. P. 水 10 μl の混合物 10 μl を再び加え (なお cDNA の製造は 13 分間 42℃ で逆トランスクリプターゼの作用により行なわれる)、次に 3 分間 95℃ に加熱して逆トランスクリプターゼを破壊する段階。

が含まれることを特徴とする、請求の範囲第 13 項に記載の方法。

15. 変性段階が、単数又は複数の請求の範囲第 1 項乃至第 11 項のいずれかに記載のリーダ対の存在する中で行なわれることを特徴とする、請求の範囲第 12 項乃至第 14 項のいずれか 1 項に記載の方法。

16. ー 雑種形成: 変性-再会合の第 1 段階のためプライマー (各プライマー 40 μmol の溶液 1 μl) を DNA マトリクス (100~300 ng) が存在する中に置く: 10 分間 100℃ で加熱しこの DNA-マトリクスとプライマの混合物を含む試験管を氷を含んだ水の中に沈める。これらのプライマは、0.8 μM という次に続く増幅段階における最終濃度で使用されなくてはならない。

ー 増幅: 前記媒質内に、各々最終溶液 (50 μl) 中で 0.5 μmol で使用される 4 つの dNTP と、50 μl の反応媒質に対し 1 単位の Taq-ポリメラーゼを付加する: この段階は、「10×バッファ」の名で呼ばれる請求の範囲第 14 項に組成が

対、

ー 特に DNA ポリメラーゼと 4 つの異なる三リン酸ヌクレオチドの増幅作業サイクルの実施に適した試薬、

ー 請求の範囲第 14 項に記載されているような「10×バッファ」緩衝液、

ー 検出すべき増幅された単数 (又は複数) の核酸配列と雑種形成することのできる、標識づけ可能な単数 (又は複数) のプローブを含む、請求の範囲第 12 項乃至第 16 項のいずれか 1 項に記載の方法の使用のためのキット。

22. 薬学的に受容可能な試剤と結びつけた状態で請求の範囲第 1 項乃至第 11 項のいずれか 1 項に記載のアンチセンスヌクレオチド配列を少なくとも 1 つ含む、ウイルス性疾患特にエイズの治療のための組成物。

23. 請求の範囲第 1 項乃至第 11 項のいずれか 1 項に記載の核酸配列の翻訳生成物及び/又は請求の範囲第 12 項乃至第 16 項のいずれか 1 項に記載の方法により増幅されたヌクレオチド配列の単数 (又は複数) の翻訳生成物と免疫反応を起こす可能性のある抗体。

24. 請求の範囲第 23 項に記載の抗体と研究対象の患者から採取した生物学的試料 (特に血清) との接触、及び場合によってこの生物学的試料の中に存在する HIV 又は SIV タイプのウイルスの抗原と前記抗体の間で形成された免疫学的複合体の検出を含む、3 つのウイルス (HIV-1、HIV-2、SIV) のうちの少なくとも 1 つによる動物の感染又は HIV-1 及び/又は HIV-2 タイ

示されている増幅緩衝液の中で行なわれる。

という条件の下で実施されることを特徴とする、請求の範囲第 15 項に記載の方法。

17. HIV-1 及び/又は HIV-2 タイプのウイルスによるヒトの感染又は 3 つのウイルス (HIV-1、HIV-2、SIV) の 1 つ以上による動物の感染の生体外診断への、請求の範囲第 12 項乃至第 16 項のいずれか 1 項に記載の方法の応用。

18. HIV 又は SIV タイプのウイルスのゲノムのヌクレオチド配列の増幅とそれに続く、請求の範囲第 1 項乃至第 11 項のいずれか 1 項に記載のヌクレオチドリーダからこれらの増幅された配列をタンパク質に翻訳する作業への、請求の範囲第 12 項乃至第 16 項のいずれか 1 項に記載の方法の応用。

19. 請求の範囲第 1 項乃至第 11 項のいずれか 1 項に記載の核酸配列の単数 (又は複数) の翻訳生成物及び/又は請求の範囲第 12 項乃至第 16 項のいずれか 1 項に記載の方法により増幅されたヌクレオチド配列の単数 (又は複数) の翻訳生成物を含む免疫原化合物。

20. MMy4Bbis-MMy28bis、MMy26-MMy5bis、MMy8bis-MMy89、MMy89bis-MMy9bis、MMy25-MMy27、MMy26-MMy27、MMy28-MMy29bis、MMy29-MMy30bis、MMy30-MMy31bis、MMy31-MMy32bis、といった、請求の範囲第 12 項乃至第 16 項のいずれか 1 項に記載の方法の利用のためのオリゴヌクレオチドリーダ対。

21. ー 請求の範囲第 1 項乃至第 11 項又は第 20 項のいずれか 1 項に記載の、少なくとも 1 対のオリゴヌクレオチドリーダ

ブのウイルスによるヒトの感染を「生体外」で診断する方法。

25. 請求の範囲第 23 項に記載の抗体及び場合によってはこれらの抗体と HIV 及び/又は SIV ウイルスの抗原の間で起こった免疫学的反応を実証するのに適した試薬を含む、請求の範囲第 24 項に記載の方法の使用のためのキット。

26. 1/10 に希釈されたとき、

ー トリス-HCl、pH8.9: 50 mM;

ー (NH₄)₂SO₄: 15 mM

ー MgCl₂: 5 mM

ー β-メルカプト-エタノール: 10 mM

ー ゼラチン: 0.25 mg/ml

を含むことを特徴とする、請求の範囲第 12 項に記載の方法の雑種形成段階又は請求の範囲第 14 項に記載の方法のウイルス RNA の逆転写段階において使用可能な緩衝液溶液 (「10×バッファ」)。

明 細 書

H I V - 1、H I V - 2 及び S I V タイプのレトロウイルスのゲノムからのヌクレオチド配列、並びに、特に、これらのレトロウイルスのゲノムの増幅のため及びこれらのウイルスによる感染の「生体外」診断のためのこれらの配列の応用

本発明は、H I V タイプのヒト免疫不全レトロウイルス又は S I V タイプのサル免疫不全レトロウイルスに特異な核配列の増幅技術の使用のために用いることができるオリゴヌクレオチド配列に関する。

本発明は特に、H I V (現在 H I V - 1 及び/又は H I V - 2) タイプのレトロウイルスによるヒトの感染についての人間の生体外 (in vitro) 診断方法としてこれらの配列を応用することに関する。

H I V - 1 及び H I V - 2 という呼称でまとめられるレトロウイルスの分離及び特徴づけは、それぞれ欧州特許出願明細書第 85/905, 513, 9号及び第 87/400, 151, 4号の中で記述されている。これらのレトロウイルスは、リンパ節疾患又は後天性免疫不全症候群 (エイズ) の症状を示す複数の患者において分離された。

H I V - 2 タイプのレトロウイルスは、H I V - 1 タイプのレトロウイルスと同様、ヒト T 4 リンパ球に対する向性及び増殖した場合のこれらのリンパ球に対する細胞変性効果ひいては中でも全身性で持続性の多発腺症すなわちエイズをひき起こす効果によって特徴づけされる。

それまでの S T L T - III という名称に代わって S I V - 1 とい

同様にして、クラス H I V - 1 を代表するレトロウイルスの c D N A の完全なヌクレオチド配列は、WAIN HOBSON, SONIGO, COLE, DANOS 及び ALIZON により CELL (1985年1月) の中に記述されている。

同様に言葉の便宜上、H I V - 1 及び H I V - 2 タイプのウイルスは以下時として H I V という表現で呼ばれる。

現在存在する H I V - 1 又は H I V - 2 タイプのウイルスによる感染の「生体外」診断方法は、例えば抗体と抽出物又は抗原の場合によって発生する免疫反応の生成を可能にする条件の下で H I V - 1 又は H I V - 2 の抗原又は抽出物と生物学的流体を接触させることによる、研究対象の患者から得られた血清中などの生物学的流体中又は生物学的採取物中に場合によって存在する抗体 A N T I - H I V - 1 又は a n t i - H I V - 2 の検出 (生検) を利用する。

このような診断方法は、特に H I V タイプのウイルスにヒトが最近感染した場合には、誤って陰性となる危険性をはらんでいる。

遺伝子増幅技術は、特にウイルス性疾患に敏感な生体外診断方法の完成にとって著しく助けとなるものである。これらの遺伝子増幅技術としては、欧州特許出願明細書 1986年3月27日付の第 86/302, 298, 4号及び 1987年1月9日付の第 87/300, 203, 4号の中に記述されているような P C R (ポリメラーゼ連鎖反応) 技術、或いはまた Biotechnology 第 6 巻 p 1197 (1988年10月) に記述されているいわゆる

う名称で呼ばれているもう 1 つのレトロウイルスはアカゲザルにおいて分離された (M.D. DANIEL 他、Science、228、1201 (1985年); N.L. LETWIN 他、Science、230、71 (1985年)、「S T L V - III」の呼称で)。

「S T L V - III_{mac}」(又は S I V_{mac}) と呼ばれるもう 1 つのレトロウイルスは、野生のサバンサモンキーにおいて分離された。しかし、アカゲザルに存在するウイルスとは異なり、S T L V - III_{mac} の存在は、アフリカのサバンサモンキーにおいてエイズタイプの疾病を誘発しないように思われる。

言葉の便宜上、以下においては、これらのウイルスは、S I V という表現 (S I V という表現は「Simian Immunodeficiency Virus」(サルの免疫不全症ウイルス) という英語の略語である) と場合によってそれに続くこれらウイルスが出てきたサルの種を表わす略語すなわちアカゲザル (macaque) に対する「M A C」又はアフリカサバンサモンキーに対する「A G M」(「African Green Monkey」の略) でのみ呼ばれる。

レトロウイルス S I V - 1 M a c の菌株は 1986年2月7日に I - 521 という番号で C. N. C. M. に寄託された。

レトロウイルス H I V - 1 及び H I V - 2 の研究を続行するにつれて、そのゲノムの RNA の相補的 DNA (c D N A) の配列を得ることもできた。H I V - 2 クラスを代表するレトロウイルスの c D N A の完全なヌクレオチド配列 (H I V - 2, R O D) は、1986年2月21日、照会名 L A V - 2 R O D で I - 522 として C. N. C. M. に寄託された。

「Q β レプリカーゼ」技術、及び国際特許出願明細書第 W O 89/01050号に記述されている RNA ポリメラーゼ (T7 RNA ポリメラーゼ) を用いて行なう技術、を挙げることができる。これらの技術は、ウイルスの核酸の検出感度を改善できるようにし、特異的合成リーダの使用を必要とする。

H I V タイプのウイルスの研究に関しては、リーダ (先導配列) の選択に問題が多い。実際、ウイルス性ゲノムのヌクレオチド配列はきわめて可変的であることから、H I V タイプのウイルスの一定の与えられた隔離集団の既知の配列に適合するリーダは、H I V タイプのいくつかの変型ウイルスの増幅を起こしそうな可能性がある。一方、1つの H I V ウイルスからもう 1 つの H I V ウイルスへと保存されたゲノム領域の中でリーダが選択された場合、その「良好な機能」はそれだからといって保証されているわけではなく、増幅収量不良をひき起こす可能性がある。

本発明はまさに、なかでも、現在の技術状態では最大と考えられる収量で特に数多くの、非特異性帯域の存在を避けるような、H I V 及び S I V タイプの全てのウイルスのゲノムの特に診断を目的とした増幅を可能とするオリゴヌクレオチドリーダを提供する。

本発明のリーダは、H I V - 1 群のウイルス及び/又は H I V - 2 及び S I V 群のウイルスに同時に特異的であり、これらのウイルスのゲノムの変異に対する感受性をもたない。

本発明の目的は、H I V - 1 タイプ及び/又は H I V - 2 及び S I V タイプのウイルスのゲノム増幅のために使用することができ

る約15個乃至30個のヌクレオチドのオリゴヌクレオチドリーダにある。

本発明は、

- HIV-1 Bru、HIV-1 Mal、HIV-1 Eli、HIV-2 ROD及びSIV MACウイルスの gag、vpr及びpol遺伝子内又はHIV-2 ROD及びSIV MACウイルスのnef2、vif2及びvpx遺伝子又はHIV-1 Bru、HIV-1 Mal及びHIV-1 Eliウイルスのenv、nef1、vif1及びvpr遺伝子内に含まれているヌクレオチド配列のうちの1つの中に含まれている配列の中から、より限定的には以下に規定するヌクレオチド連鎖の中に含まれている配列の中から選ばれていること、
- 又は、(特に最も長い配列について)、HIV-1 Bru、又はHIV-1 Mal又はHIV-1 Eli又はHIV-2 ROD又はSIV MACからの前記ヌクレオチド配列のうちの1つを含むか、又はこれらの配列の相補的ヌクレオチド配列を含み、末端3'又は5'の側で当該種類のヌクレオチド配列から「はみ出す」相補的ヌクレオチドがある場合それらは好ましくは上記HIV-1、HIV-2又はSIV MACタイプのウイルスの完全配列自体の中に相応する末端5'又は3'の手前に置かれているものと一致すること、
- 又はこのヌクレオチド配列が上述のヌクレオチド配列の1つと同一でない場合又はこれらの配列の1つと相補的でない場合、それでもHIV-1 Bru、HIV-1 Mal、HIV-1

-1 Bru、HIV-1 Mal、HIV-1 Eli、HIV-2 ROD及びSIVに相応するゲノム上のヌクレオチドの位置を示す)：

上述のウイルスのゲノムのgag遺伝子の特異的配列(これらのウイルスの核様体の特異的抗原群についてコード化する遺伝子)。

HIV及び/又はSIVタイプのウイルスの遺伝子とこれらのヌクレオチド配列の雑種形成特性に影響を及ぼすことなく、下記ヌクレオチド配列のいくつかの位置に対しいくつかの変異型を加えることも可能である。これらの変異型を含むヌクレオチド配列は、単数又は複数の塩基の置換によってそれが誘導された元のヌクレオチド配列の下に表示されている。元のヌクレオチド配列の塩基との関係において変更された塩基は、これらの元の配列内の置換された塩基に相応する位置に垂直に略さずに表示されている：一方これらの変異型を有する配列内の置換されなかった元の配列の塩基は点線を用いて示されている。

リーダの合成は、すべての変異型を同時に用いることにより行なわれる。テストにおいて用いられるのは、1つの与えられた配列に対する全ての変異型の混合である。

MMy1: TGG CGC CCG AAC AGG GAC

... ..T.

S, 636-653, 635-652, 636-653, 859-876, 834-851

MMy2: GGC CAG GGG GAA AGA AAA A

... ..C.

Eliウイルスからのヌクレオチド配列と及び/又は上述のHIV-2 ROD又はSIV MACウイルスからのヌクレオチド配列と雑種形成する可能性があること

を特徴とするあらゆるヌクレオチド配列に関する。雑種形成(ハイブリッド形成)は、最適な収量を得るのに推奨される60℃±1℃(好ましくは60℃±0.5℃)の温度で行なうことができる。

上述のヌクレオチドの番号づけは、「Los Alamos国立研究所-米国ニューメキシコ州」により編集された「ヒトレトロウイルスとエイズ-1989年」という参照マニュアルの中で用いられているものと一致する。(HIV-1 Mal、HIV-1 Eliウイルスの配列については、1986年6月23日付の欧州特許出願明細書第86.401380号の中でMONTAGNIER, SONIGO, WAIN-HOBSON及びALIZONにより記述された)。

本発明の配列は、Applied Biosystemsにより市販されている合成装置(リン酸-亜ミノ酸塩法)又はその他の類似の方法を用いるあらゆる装置で合成される。

本発明はさらに限定的に言うと、以下のヌクレオチド連鎖を特徴とするオリゴヌクレオチド配列に関する(なおこれらの連鎖は5'→3'の方向に示され、頭文字「S」及び「AS」はオリゴヌクレオチドがセンスか又はアンチセンスかすなわちそのオリゴヌクレオチドがそれぞれ5'→3'の方向又は3'→5'の方向に向けられているかを示している)：

1) HIV-1、HIV-2及びSIVウイルスのゲノムに共通の配列(1本の線で間隔どりされた一連の数字は、それぞれHIV

... ..A.

S, 854-872, 864-888, 848-872, 1160-1184,

1124-1148

MMy3: TGC CCA TAC AAA ATG TTT TA

... ..C..T.T

AS, 900-881, 916-897, 900-881, 1212-1193,

1176-1157

MMy4: TGC ATG GCT GCT TGA TG

... ..AC ..G ..

AS, 1385-1369, 1419-1403, 1385-1369, 1703-1687,

1667-1651

MMy4B: CTT TGC ATG GCT GCT TGA TG

... ..CAC ..G ..

AS, 1388-1369, 1421-1403, 1388-1369, 1706-1687,

1670-1651,

MMy4Bbis: CAT CAA GCA GCC ATG CAA AG

... ..C ..GTG ..

S, 1369-1388, 1403-1421, 1369-1388, 1687-1706,

1651-1670,

MMy28: AGG GCT GTT GGA AAT GTG G

... ..G

S, 2021-2039, 2055-2073, 2024-2042, 2329-2349,

2299-2318,

MMy28bis: CCA CAT TTC CAG CAT CCC T

... ..G ...
C ...
 AS, 2039-2021, 2073-2055, 2042-2024, 2349-2329,
 2318-2299

vpr 遺伝子に特異的な配列

MMy18: GAT AGA TGG AAC AAG CCC CAG
 S, 5590-5610, 5585-5605, 5554-5574, 6233-6296,
 6147-6170.
 MMy19: TCC ATT TCT TGC TCT CCT CTG T
 AS, 5870-5849, 5865-5844, 5834-5813, 6551-6531,
 6454-6431.

pol 遺伝子に特異的な配列

MMy29: TAA AGC CAG GAA TGG ATG GCC CAA
A ...
 S, 2620-2643, 2615-2638, 2584-2607, 2971-2994,
 2887-3010
 MMy29bis: TTG GGC CAT CCA TTC CTG GCT TTA
T ...
 AS, 2643-2620, 2638-2615, 2607-2584,
 2994-2971, 3010-2887.
 MMy30: TGG ACT GTC AAT GAC ATA CAG AA
T ...
 S, 3339-3361, 3334-3356, 3303-3325, 3690-3712,
 3606-3628.

化する)

MMy12: AGA GAC TCT TGC GGG CGC GTG
 S, 9165-9185, 9139-9159.
 MMy13: ATA TAC TTA GAA AAG GAA GAA GG
 S, 9542-9564, 9516-9538.
 MMy13bis: CCT TCT TCC TTT TCT AAG TAT AT
 AS, 9564-9542, 9538-9516.
 MMy14: AGC TGA GAC AGC AGG GAC TTT CCA
 AS, 9956-9933, 9893-9870.

vif 2 遺伝子の特異的配列 (2.3 kDの感染力因子についてコード化する)

MMy20: TAT GGA GGA GGA AAA GAG ATG GAT AGT
 S, 5424-5450, 5340-5366.
 MMy21: TAG CAC TTA TTT CCC TTG CTT T
 S, 5754-5775, 5670-5691.
 MMy21bis: AAA GCA AGG GAA ATA AGT GCT A
 AS, 5775-5754, 5691-5670.
 MMy22: CCC TTG TTC ATC ATG CCA GTA T
 AS, 6082-6061, 5995-5974.

vpX 遺伝子の特異的配列 (1.2 kDのタンパク質についてコード化する)

MMy23: ATG TCA GAT CCC AGG GAG A
 S, 5900-5918, 5813-5831.
 MMy24: CCT GGA GGG GGA GGA GGA GGA

MMy30bis: TTC TGT ATG TCA TTG ACA GTC CA
T ...
 AS, 3361-3339, 3356-3334, 3325-3303,
 3712-3690, 3628-3606.

MMy31: CAT GGG TAC CAG CAC ACA AAG G
 S, 4186-4207, 4181-4202, 4150-4171, 4534-4555,
 4450-4471.

MMy31bis: CCT TTG TGT GCT GGT ACC CAT G
 AS, 4207-4186, 4202-4181, 4171-4150,
 4555-4534, 4471-4450.

MMy32: TGG AAA GGT GAA GGG GCA GT
A ...
 S, 4992-5011, 4987-5006, 4956-4975, 5340-5359,
 5256-5275.

MMy32bis: ACT GCC CCT TCA CCT TTC CA
T ...
C ...
 AS, 5011-4992, 5006-4987, 4975-4956,
 5359-5340, 5275-5256

2) HIV-2 及び SIV ウイルスのゲノムに共通の配列 (一本の線で間隔どりされた一連の数字は、それぞれ HIV-2 ROD 及び SIV-MAC に相応するゲノム上のヌクレオチドの位置を示している)。

nef 2 遺伝子の特異的配列 (2.7 kDの陰性因子に対しコード化する)

AS, 6228-6208, 6141-6121.

3) HIV-1 Bru, HIV-1 Mal 及び HIV-1 E1i ウイルスのゲノムに共通の配列 (1本の線により間隔どりされた一連の数字は、それぞれ HIV-1 Bru, HIV-1 MA1 及び HIV-1 E1i ウイルスに相応するゲノム上のヌクレオチドの位置を示している)

env 遺伝子の特異的配列 (外被タンパク質に対してコード化する)

MMy5: CCA ATT CCC ATA CAT TAT TGT GCC CC
 S, 6905-6930, 6903-6928, 6860-6885
 MMy5bis: GGG GCA CAA TAA TGT ATG GGA ATT GG
 AS, 6930-6905, 6928-6903, 6885-6860.
 MMy6: AAT GGC AGT CTA GCA GAA GAA GA
 S, 7055-7077, 7053-7075, 7010-7032
 MMy7: ATC CTC AGG AGG GGA CCC AGA AAT T
 S, 7360-7384, 7349-7373, 7306-7330
 MMy7bis: AAT TTC TGG GTC CCC TCC TGA GGA T
 AS, 7384-7360, 7373-7349, 7330-7306
 MMy8: GTG CTT CCT GCT GCT CCC AAG AAC CC
 AS, 7857-7832, 7846-7821, 7800-7775
 MMy8bis: GGG TTC TTG GGA GCA GCA GGA AGC AC
 S, 7832-7857, 7821-7846, 7775-7800.
 MMy9: ATG GGT GGC AAG TGG TCA AAA AGT AG
A ...

S. 8844-8869, 8836-8861, 8787-8812,
MMy9bis: CTA CTT TTT GAC CAC TTG CCA CCC AT
AS. 8869-8844, 8861-8836, 8812-8787,
MMy78: TAT TAA CAA GAG ATG GTC G
S. 7629-7647, 7612-7630, 7572-7590,
MMy89: CCA GCA AGA AAA GAA TGA A
S. 8224-8242, 8213-8231, 8167-8185,
MMy89bis: TTC ATT CTT TTC TTG CTG G
AS. 8242-8224, 8231-8213, 8185-8167,
nef1 遺伝子の特異的配列
MMy10: AAA AGA AAA GGG GGG ACT GGA
S. 9116-9136, 9117-9137, 9062-9082,
MMy10bis: TCC AGT CCC CCC TTT TCT TTT
AS. 9136-9116, 9137-9117, 9082-9062,
MMy11: AAA GTC CCC AGC GGA AAG TCC C
AS. 9503-9483, 9505-9484, 9449-9428,
vif 遺伝子の特異的配列
MMy15: GAT TAT GGA AAA CAG ATG GCA GGT GAT
S. 5073-5099, 5068-5094, 5037-5063,
MMy16: GCA GAC CAA CTA ATT CAT CTG TA
S. 5383-5405, 5378-5400, 5347-5369,
MMy16bis: TAC AGA TGA ATT AGT TGG TCT GC
AS. 5405-5383, 5400-5378, 5369-5347,
MMy17: CTT AAG CTC CTC TAA AAG CTC TA

に記されている技術的な使用上の指示が実施された場合、一般に非特異性帯域の無い明確な増幅帯域を与えるという点にある。これは、雑種形成の特異性を高める27個の塩基に達しうるリーダの長さ、ならびに外乱性会合を除去することのできる徹底的な使用条件によるものである。各タイプのウイルスに対する特異性は、基準マトリクスとの相似性百分率の関数であると同時に、受諾できる収量について40個の塩基に達しうるリーダの長さの関数でもある。

本発明は同様に、1988年8月1日付の欧州特許出願明細書第88/307,102,9号内に記述されているようなDNA又はRNAの多数のコピーの合成によるゲノム増幅方法の利用のためにその末端5'のレベルで1つのプロモータに結びつけられている上述のようなリーダにも拡大される。

本発明は特に、HIV-1及び/又はHIV-2タイプのウイルスによるヒトの潜在的感染又は3つのウイルス(HIV-1, HIV-2, SIV)のうちの少なくとも1つによる動物の潜在的感染の生体外診断に¹対し応用することのできる、HIV-1及び/又はHIV-2タイプ又はSIVタイプのウイルスの核配列の遺伝子増幅を実施するための上述のリーダの利用をその目的としている。

本発明のこの生体外診断方法は、研究対象の患者から得られた生物学的試料(例えば循環血液の血清、リンパ球といった生物学的液体)を用いて実現され、主として次のような段階を含む:

- 上述の生物学的試料の中に場合によって存在するHIV-1及

AS. 5675-5653, 5670-5648, 5639-5617,

vpu 遺伝子の特異的配列

MMy25: GTA AGT AGT ACA TGT AAT GCA ACC T
S. 6081-6105, 6076-6100, 6045-6069,
MMy26: AGC AGA AGA CAG TGG CCA TGA GAG
S. 6240-6263, 6238-6261, 6207-6230,
MMy27: ACT ACA GAT CAT CAA TAT CCC AA
AS. 6343-6321, 6338-6316, 6307-6285,

本発明は同様に、上述のリーダの配列に相補的なヌクレオチド構造を有する配列(リーダ)をもその目的としている。

本発明は同様に、配列の上述のような雑種形成特性が変更されることなく、上述のものとの関係においていくつかの突然変異を示すヌクレオチド配列にも関する。そのために本発明の配列の雑種形成特性に影響を与えることなく、上述の配列を構成するヌクレオチドと異なるヌクレオチドの百分率は40%に達しうる。

一般的に言って、センス(S)リーダ(プライマ)の場合において、リーダの3'側に比べ5'側でより多くの突然変異が耐容され、3'側は、配列増幅を可能にするため1つの核配列の一定のストランド(鎖)と完全に雑種形成しなくてはならない。アンチセンス(AS)リーダの場合、3'側で耐容が可能である。

本発明の目的は同様に、上述の雑種形成特性が変更されることなく、一時的変異が中央部分に含まれ、各々の側に5つ以上の塩基の保持を伴う上述のようなリーダにもある。

本発明のオリゴヌクレオチドリーダの特徴の1つは、本発明の中

び/又はHIV-2及び/又はSIVタイプのウイルスのゲノムに属する検出すべき核酸の抽出段階、及び場合によっては、2本鎖核酸を得るための、この核酸がRNAの形をしている場合の核酸の逆トランスクリプターゼ(逆転写酵素)を用いた処理段階(なおこの後者の段階は以下でウイルスRNAのレトロトランスクリプション(逆転写)段階とも呼ばれている)

- 1本鎖核酸の形成に導く、検出すべき2本鎖核酸の変性の段階、

以下に定める雑種形成条件の下で本発明に従った少なくとも1つのリーダ対と上記ストランドを接触させることによる、本発明に基づく少なくとも1つのリーダと、上記変性段階の際に得られた核酸鎖の各々との雑種形成の段階

1つの重合剤(DNAポリメラーゼ)と異なる4つのヌクレオシド三リン酸(dNTP)が存在する中でリーダが上で雑種形成されるようなストランドと相補性をもつDNAを、これらのリーダから形成し、かくして先行する変性段階に比べさらに多くの2本鎖核酸の形成がもたらされる段階

を含み、かつ場合によって生物学的試料の中にその検出を可能にするだけ十分な割合で存在する検出すべき前記核配列を得るため規定の回数だけくり返されるようなサイクル。

生物学的試料内にHIV-1及び/又はHIV-2及び/又はSIVタイプのウイルスのゲノムに属する核酸が場合によって存在することを検出する段階。

上述の雑種形成段階は、以下に組成(最終使用濃度単位)が示さ

れている緩衝液「10×バッファ」内で1分30秒間60℃にて有利に実現される。

本発明の生体外診断方法は、ウイルス性RNAを用いて、或いはまたエピゾーム又は組込み型の相補的DNAを用いて実現できる。

実際、HIV及びSIVウイルスのゲノムは、生物内のウイルスの局在化に応じてRNA又はDNAの形で現われる。

ウイルスが生体の細胞内部特に血液細胞内にある場合、そのRNAは、逆トランスクリプターゼによりDNAに再複製される。反対に、特に血液中の細胞外環境内のHIVタイプのウイルスのゲノムは、RNAの形にとどまる。

(クロロホルムフェノールでの従来の方法以外に) 当該発明人により推奨されている生物学的試料の細胞内に含まれているウイルス性DNAの本発明に従った抽出段階は、以下の段階を含む：

- ・ ボッタ大ピストン内で熱分解された0.5mlの水の中での細胞沈渣の懸濁段階、
- ・ いわゆる「往復運動による」細胞の粉碎段階、
- ・ 最終濃度が0.1%になるような、1対「×100トリトン」の付加段階、
- ・ 100℃で15分乃至25分間の熱による変性段階、
- ・ 細胞残滓のみを除去するための短い遠心分離段階、
- ・ 無水エタノール2.5体積と最終体積の10%の3モルの酢酸ナトリウムの付加による-20℃で一晩中のDNAの沈殿段階。DNAは次に回収されて、70℃でエタノールにより2回洗浄された後熱分解水の中に再懸濁させられる。ここでこの方法は

Taq-ポリメラーゼ+各25mMの4つのdNTPの混合物1μl+Q.S.P.水10μlの混合物10μlを加える。従って最終体積は50μlとなる。

この反応は次の2段階で行なわれる：

- a) 第1段階：13分間42℃での逆トランスクリプターゼの作用によるcDNAの製造、
- b) 第2段階：従来の遺伝子増幅：逆トランスクリプターゼを破壊し雑種形成解除／雑種形成段階を可能にするため3分間95℃に加熱し、次に遺伝子増幅のため前述のサイクルを開始する。

本発明はさらに限定に言って、本発明の単数(又は複数)のリーダー(又はプライマ)対の存在する中で変性段階が行なわれる、前述のような生体外診断方法をその目的としている。実際、上に明記したように、本発明のオリゴヌクレオチド(又はプライマ)の特徴の1つは、以下の条件の下で用いられた場合に、一般に非特異性帯域の無い明確な増幅帯域を与えるという点にある：

- **雑種形成**：変性-再会合の第1段階のためプライマ(各プライマ40μM(40μM)の溶液1μl)をDNA-マトリクス(100~300ng)が存在する中に置く；10分間100℃で加熱しこのDNA-マトリクスとプライマの混合物を含む試験管を氷を含む水の中に沈めてDNA-マトリクス／プライマの再会合率を増大させる。これらのプライマは、0.8μMという次に続く増幅段階における最終濃度で使用されなくてはならない。
- **増幅**：前記媒質内に、各々最終溶液(50μl)内で0.5μ

DNAとRNAの同時沈殿を可能にし、従って、「DNA直接PCR」と呼ばれる方法又は「PCR-RNA」と呼ばれる方法の使用によるHIV又はSIVタイプのウイルスのゲノムメッセージの検出が可能となる、ということに留意されたい。

ウイルス性RNAの抽出段階は一般に、当業者にとって従来通りの方法で行なわれる。

RNAの抽出後、そのゲノムがRNAの形をしているHIV-1及び／又はHIV-2及び／又はSIVタイプのウイルスを含む生物学的試料を用いて本発明の生体外診断が行なわれる場合、1本鎖のRNAから2本鎖のDNAへの形質転換という補足的段階を実施する必要がある。

RNAからDNAへのこの形質転換は、逆トランスクリプターゼを用いた適当な媒質内での生物学的試料特に血清の抽出後得られたRNAの処理によって実現される。

本発明はさらに限定にいうと、なかでも以下に規定するようなウイルス性RNAの逆転写(レトロトランスクリプション)段階が以下の要領で実施されるような生体外診断方法をその目的としている：

- 水中に再懸濁された抽出RNA10μlを最終体積40μl内で各々40μMの濃度でリーダー対の存在する中に置く。この全体を10分間100℃で変性し次に氷水の中に沈める。
- 上述の「10×バッファ」緩衝液5μl+1単位の逆トランスクリプターゼ[AMV(鳥類の骨髄芽球(細胞)症ウイルス)又はMuMLV(モロニー白血病ウイルス)の]+1単位の

モルで使用される4つのdNTPと、50μlの反応媒質に対し1単位のTaq-ポリメラーゼを付加する；この段階は、1/10⁶に希釈した場合、トリス-HCl、pH8.9:50mM；(NH₄)₂SO₄:15mM；MgCl₂:5mM；β-メルカプトエタノール:10mM；ゼラチン:0.25mg/μlといった組成をもつ「10×バッファ」という名で一般に呼ばれている本発明の増幅緩衝液の中で実施される。この緩衝液5μlとQ.S.P.水50μlを前述の媒質に付加する。

増幅サイクルは次の要領で行なわれる：すなわち、次のもので成る30回~40回のサイクル：

- ・ 10秒間94℃(変性)
- ・ 1分30秒間60℃(雑種形成)
- ・ 1分30秒間78℃(伸長)。

この全体の後には、15分間78℃で唯一回のサイクルが続くことになる。

±0.3℃の誤差で示されている温度の精確さならびに異なるサイクル中のその安定性は、最大収量を得、非特異性帯域が無いようにするための不可欠な条件である。

DNAの最適濃度は、(患者の又は培養で哺乳動物物その他の)細胞から抽出されたゲノムDNAについて100乃至300ngである。

当然のことながら、前述の条件は、50μlの最終反応媒質に対する最適な条件であり、これらの条件は反応媒質の最終体積に応じて修正されうるものである。

本発明の異なるリーダ対（又はリーダ対の組合せ）を複数用いることにより、H I V及び／又はS I Vタイプのウイルスの複数タイプの交差検出又は、H I V及び／又はS I Vタイプの同一ウイルスの複数の遺伝子の同時検出が可能となる。

例えば、本発明の枠内で使用可能な好ましいリーダ対としては、以下のようなリーダ対を挙げることができる：

- ・ 特にH I V-1及び／又はH I V-2によるヒトの感染の生体外診断のための、MMyl-MMy4、MMY2-MMy4、MMyl-MMy3、MMyl8-MMy19、MMY4bis-MMy28bis、MMY28-MMy29bis、MMY29-MMy30bis、MMY31-MMy32bis、
- ・ 特にH I V-1によるヒトの感染の生体外診断のための、MMY5-MMy8、MMY6-MMy8、MMY7-MMy8、MMY5-MMy7bis、MMY6-MMy7bis、MMY9-MMy11、MMyl0-MMy11、MMY9-MMy10bis、MMY26-MMy5bis、MMY8bis-MMy9bis、MMY8bis-MMy89、MMY89bis-MMy9bis、MMyl5-MMy17、MMyl5-MMy16bis、MMyl6-MMy17、MMY25-MMy27、MMY26-MMy27、
- ・ H I V-2によるヒトの感染の生体外診断のための、MMY20-MMy22、MMY20-MMy21bis、MMY21-MMy22、MMY23-MMy24、MMyl2-MMy14、MMyl2-MMy13bis。

このサイクルの伸長段階で用いられる重合剤は、熱安定性のあるDNAポリメラーゼ特にTaqポリメラーゼ、Appligene社のアンプリフィオーゼ又は市販される熱安定性あるあらゆるDNAポリメラーゼである。

一般的に言って、本発明の生体外診断方法は30回から40回反

復される。

本発明の生体外診断方法は同様に、使用されるヌクレオチドリーダ対に応じて、生物学的試料の中に存在するH I V及び／又はS I Vタイプのウイルスの遺伝子を選択的に検出することも可能にする。

本発明の上述の遺伝子毎の診断方法のために一例として用いることのできるリーダ対は以下のようなものである：

- gag遺伝子のためのMMyl-MMy4、MMY2-MMy4、MMyl-MMy3、MMY4bis-MMy28bis、
- vpr遺伝子のためのMMyl8-MMy19、
- env遺伝子のためのMMY5-MMy8、MMY6-MMy8、MMY7-MMy8、MMY5-MMy7bis、MMY6-MMy7bis、MMY26-MMy5bis、MMY8bis-MMy9bis、MMY8bis-MMy89、MMY89bis-MMy9bis、
- nef1遺伝子のためのMMY9-MMy11、MMY9-MMy10bis、MMyl0-MMy11、
- vif1遺伝子のためのMMyl5-MMy17、MMyl5-MMy16bis、MMyl6-MMy17、
- vif2のためのMMY20-MMy22、MMY20-MMy21bis、MMY21-MMy22、
- vpxのためのMMY23-MMy24、
- nef2のためのMMyl2-MMy14、MMyl2-MMy13bis、MMyl3-MMy14、
- vpu遺伝子のためのMMY25-MMy27、MMY26-MMy27、
- poi遺伝子のためのMMY28-MMy29bis、MMY29-MMy30bis、

MMY30-MMy31bis、MMY31-MMy32bis。

ただし、プライマ「S」及び「AS」の間の組み合わせは制限的なものではなく、ユーザの望みに応じて変えることができる。

一例として上で記述されたリーダ対を用いて合成されたヌクレオチドフラグメントのサイズは、以下の表IからXIまでに示されている：

（以下の表に示されている数字は、合成されたフラグメントのヌクレオチド数を表わし、「ハイフン」は、テストされたリーダ対では相応するウイルス菌株を特徴づけることができないことを示している）。

表 I

gag		:	gag		:
:MMyl-MMY3:MMyl-MMY4:MMY2-MMY4:MMY4bis-MMY28bis:					
HIV1-BRU:	265	:	750	:	532
					671
HIV1-MAL:	282	:	785	:	556
					671
HIV1-ELI:	265	:	750	:	538
					674
HIV2-ROD:	354	:	845	:	544
					663
SIV :	343	:	844	:	544
					668

表 II

env		:	env		:				
:MMy5-MMy7bis:MMy5-MMy8:MMy6-MMy7bis:MMy6-MMy8:									
HIV1-BRU:	480	:	953	:	330	:	803	:	
HIV1-MAL:	471	:	944	:	321	:	794	:	
HIV1-ELI:	471	:	941	:	321	:	791	:	
HIV2-ROD:	-	:	-	:	-	:	-	:	
SIV	:	-	:	-	:	-	:	-	:

表 III

env	:	env	:
:MMY7-MMY8:MMY26-MMY5bis:MMY8bis-MMY9bis			
HIV1-BRU:	498	:	691 : 1038
HIV1-MAL:	498	:	691 : 1041
HIV1-ELI:	495	:	679 : 1038
HIV2-ROD:	-	:	-
SIV :	-	:	-

表 IV

env	:	env	:
:MMY8bis-MMY89: MMY89bis-MMY9bis			
HIV1-BRU:	411	:	646
HIV1-MAL:	411	:	649
HIV1-ELI:	411	:	646
HIV2-ROD:	-	:	-
SIV :	-	:	-

表 V

nefl	:	nefl	:
:MMY9-MMY10bis: MMY9-MMY11: MMY10-MMY11			
HIV1-BRU:	293	:	660 : 388
HIV1-MAL:	302	:	660 : 388
HIV1-ELI:	296	:	663 : 388
HIV2-ROD:	-	:	-
SIV :	-	:	-

表 VI

nef2	:	nef2	:
: MMY12-MMY13bis:MMY12-MMY14:MMY13-MMY14			
HIV1-BRU:	-	:	-
HIV1-MAL:	-	:	-
HIV1-ELI:	-	:	-
HIV2-ROD:	400	:	792 : 415
SIV :	400	:	755 : 378

表 VII

vpr	:	vif2	:
:MMY18-MMY19: MMY20-MMY21bis: MMY20-MMY22			
HIV1-BRU:	281	:	-
HIV1-MAL:	281	:	-
HIV1-ELI:	281	:	-
HIV2-ROD:	319	:	352 : 659
SIV :	308	:	352 : 656

表 VIII

vif1	:	vif1	:
:MMY15-MMY16bis:MMY15-MMY17:MMY16-MMY17			
HIV1-BRU:	333	:	603 : 293
HIV1-MAL:	333	:	603 : 293
HIV1-ELI:	333	:	603 : 293
HIV2-ROD:	-	:	-
SIV :	-	:	-

表 IX

vif2	:	vpx	:
: MMY21-MMY22 : MMY23-MMY24			
HIV1-BRU:	-	:	-
HIV1-MAL:	-	:	-
HIV1-ELI:	-	:	-
HIV2-ROD:	329	:	329
SIV :	326	:	329

表 X

vpu		:	pol		:
:MMY25-MMY27:MMY26-MMY27:			MMY28-MMY29bis		:
HIV1-BRU:	263	:	104	:	623
HIV1-MAL:	263	:	101	:	584
HIV1-ELI:	263	:	101	:	584
HIV2-ROD:	-	:	-	:	666
SIV:	-	:	-	:	712

表 XI

pol		:	pol		:
:MMY29-MMY30bis:MMY30-MMY31bis:MMY31-MMY32bis					:
HIV1-BRU:	742	:	869	:	826
HIV1-MAL:	742	:	869	:	826
HIV1-ELI:	742	:	869	:	826
HIV2-ROD:	742	:	866	:	826
SIV:	742	:	866	:	826

又は複数の硫黄原子を有するいくつかのヌクレオチドを含む上述のオリゴヌクレオチドにも関する。このようなオリゴヌクレオチドは2重らせんの安定性を増大させ、ひいては増幅すべきDNA鎖とより良く雑種形成するという特徴を呈する。

本発明は同じく、特に「La Vie des Sciences(科学ライフ)」報告書、一般シリーズ、第4巻、No.1、p17-37の中に掲載されたC. Heleneの論文に記されている方法に従って、発光剤(オレンジアクリジンといった平坦な芳香族分子)が上で共有結合的に移植されているヌクレオチドを含むいわゆる「修正塩基」の形を呈する上述のようなオリゴヌクレオチドにも関する。このようなオリゴヌクレオチドは、特に蛍光により容易に検出可能であるという特徴をもつ。

本発明のオリゴヌクレオチドは同様に、SIVタイプのウイルスによるサル(アカゲザル、マンガベイザル又はサバンサモンキー)の感染の生体外診断方法の実施のためにも使用できる。なおこの方法は上述のものの主要な特徴を受け継いでいる。

本発明のもう1つの目的は、上述の生体外診断方法の実施のための診断用キットにある。一例を挙げると、本発明の診断用キットには以下のものが含まれる:

- 検出すべき核酸配列のストランドの1つと雑種形成するリーダー及び上述の条件下で上述のストランドの相補ストランドと雑種形成するリーダーを各々含む少なくとも1つの本発明に基づくオリゴヌクレオチドリーダー対、
- 特にDNAポリメラーゼと4つの異なる三リン酸ヌクレオチド

ゲノム上でのその配置により、増幅に役立つプライマは、「サザントランスファ」による分析の際に観察された増幅帯域の特異性を確認するため低温プローブ技術において使用するため、又はキネーションによる³²Pでの標識づけの後に、プローブとして用いることができるように、組合わせ可能であるということに留意された。第3のオリゴヌクレオチドが特異的内部プローブとして役立つようにするための従来のリーダー組合せに加えて、交差検出を可能にするこれらの遺伝子の重複による遺伝子 $vif1/vpr$ 及び $vif2/vpx$ の特殊なケースにも留意されたい。さらに、増幅されたDNAの配列決定による分析の際に、これらのオリゴヌクレオチドは、各方向における2重配列づけ従って配列の2重読みとりを可能にしかくして場合によって起こる解釈のあいまいさを無くするようなDNAポリメラーゼに対し特異的なリーダーとして用いることができる。

本発明の目的は同様に、特に放射線又は酵素によって標識づけされた上述のもののようなリーダー、ならびに特に上述のような生体外診断方法の枠内でのヌクレオチドゾンデとしてのその利用にもある。

本発明はまた、α立体配座の體を含む上述のようなオリゴヌクレオチドをもその目的としている。このようなオリゴヌクレオチドは、マトリクスと共に形成された2重らせんの方向を逆転させる特徴をもち(ウイルスのゲノムのストランド)、この2重らせんはかくして「S」状態から「AS」状態に移行する。

本発明は同様に、メチル化され及び/又は特にアデニン上に単数

の増幅作業サイクルの実施に適した試薬、及び上述の「10×バッファ」と呼ばれる反応媒質、

- 検出すべき増幅された単数(又は複数)の核酸配列と特異的に雑種形成することができる、低温プローブ技術又は放射能によって特に標識づけされうる単数(又は複数)のゾンデ。

本発明はまた、これらのリーダーを用いて増幅されたヌクレオチド配列によってコード化されたタンパク質の合成方法の実施のための、前述の本発明に基づくリーダーの利用にも関する。

一例を挙げると、このタンパク質合成方法は、上述の条件下で本発明に基づく少なくとも1つのリーダー対と配列を接触させることにより(一定のタンパク質についてコード化した場合によってはそのヌクレオチドの或る種の変更を受けた)HIV又はSIVタイプのウイルスのゲノムのヌクレオチド配列を増幅させる段階と、それに続いてこうして増幅されたこれらの配列をタンパク質に翻訳する段階を含んでいる。なおこの後者の段階は、特に、増幅された前記配列を含むベクタを用いて適切な宿主細胞を形質転換し、これらの宿主細胞内で生成されたタンパク質を回収することによって実施される。

本発明は同じく、本発明のヌクレオチド配列(又はリーダー)の翻訳から得られたポリペプチドにも関する。

本発明の目的は、特にエイズ予防活動における抗ウイルス剤全般としてのアンチセンスオリゴヌクレオチドリーダーの利用、ならびに薬学的に受容できる賦形剤と結びつけた形でこれらのアンチセンスリーダーを含む薬劑化合物にもある。

本発明は同様に、本発明に基づくヌクレオチド配列の単数又は複数の翻訳生成物及び／又は本発明に従って構成されたリーダから上述の方法に従って増幅されたヌクレオチド配列の単数又は複数の翻訳生成物を含む免疫化合物にも関する。なおこれらの翻訳生成物は、薬学的に受容できる賦形剤に結びつけられている。

本発明は、上述の単数又は複数の翻訳生成物に対して向けられた（換言すると、本発明に従ったヌクレオチド配列の単数又は複数の翻訳生成物又は本発明に従って構成されたリーダを用いて増幅されたヌクレオチド配列の単数又は複数の翻訳生成物と免疫反応を形成することのできる）抗体、ならびに当業者にとって既知の方法に従いHIV-1及び／又はHIV-2タイプのウイルスによるヒトの感染又は3つのウイルス（HIV-1、HIV-2、SIV）のうちの少なくとも1つによる動物の感染の生体外診断方法の実施のためのその利用、に関する。

一例を挙げると、本発明に従ったこのような生体外診断方法は、研究対象の患者から採取した生物学的試料（特に血清）を本発明に基づく抗体と接触させる作業、及び場合によって生物学的試料の中に存在するHIV又はSIVタイプのウイルスの抗原と前記抗体の間に形成された免疫学的複合体を（特に標識づけされた抗免疫グロブリンを用いて）適切なあらゆる方法で検出する作業を含んでいる。

本発明は同様に、本発明に従った抗体及び、場合によっては、HIV又はSIVウイルスの抗原とこれらの抗体の間で形成された免疫反応を立証する適切な試薬を含む、生体外診断用キットをもそ

の目的としている。

本発明は又、上述のポリペプチド特に国際遺伝コードに従い上述のヌクレオチド配列（又はリーダ）に相応するポリペプチドの調製方法において、好ましくはC末端アミノ酸から出発して、必要とされる順の連続するアミノアシル又は適切な順序で複数のアミノアシル残基をすでに含む予め形成されたフラグメントとアミノアシル、或いは又こうして予め調製された複数のフラグメントを2つずつ連続的に縮合すること、なお、これは順次段階的に接近するようにN末端アミノ酸に至るまで、ペプチド合成において既知の方法に従って行なわれ、特にカルボキシル基の活性化の後ペプチド結合の形成に通常介入しなくてはならないような一方のアミノ基及び他方のカルボキシル基又はその逆を除くこれらのアミノアシル又はフラグメントが支持する全ての反応基は予め保護しておくことを特徴とする方法にも関する。

例えば、1974年E. Wunschにより編集された「*Methoden der Organischen Chemie*」（有機化学の方法）第15-I及びII巻、THIEME, STUTTGART の中でHoubenweylが記した均質溶液ペプチド合成技法又は、R.D. Merrifieldが「固相ペプチド合成（Solid Phase Peptide Synthesis）」（J. AM. CHEM. SOC., 45, 2149-2154）に記した固相ペプチド合成法を利用することができる。

本発明は同様に、上述のヌクレオチド配列（又はリーダ）の調製方法において、

— DNA...（デオキシリボヌクレアーゼ）Iを用いて上述のHIV又はSIVタイプのウイルスから分離したグノミック

DNAを保温し、その後EDTAを付加し、フェノール／クロロホルム／イソアミルアルコール（25／24／1）の混合物次にエーテルでの抽出により精製を行なう段階、

— DTTの存在する中でEcoRIメチラーゼによりこうして抽出されたDNAを処理し、上述のような抽出により精製を行なう段階、

— *E. coli*（大腸菌）のDNAリガーゼとT₄ DNAポリメラーゼの存在する中で4つのデオキシヌクレオチド三リン酸dATP、dCTP、dGTP及びdTTPを用いてこうして精製されたDNAを保温しその後上述の方法に従って精製する段階、

— こうして得られた核酸を適切なベクターの中でクローニングし適切なプローブを用いて求める核酸を回収する段階、

を含むような方法にも関する。

本発明のヌクレオチド配列の特に有利な調製方法には、以下の段階が含まれる：

— 「*Bioorganic Chemistry*（生物有機化学）」4：274-325（1986年）内に記されたリン酸亜アミノ酸β-シアニエチルの自動化された方法を用いてDNAを合成する段階、

— こうして得られた核酸を適切なベクター内でクローニングし、適切なプローブでの雑種形成により核酸を回収する段階。

本発明のヌクレオチド配列のもう1つの調製方法は、以下の段階を含んでいる：

— Proc. Natl. Acad. Sci USA（米国国立科学アカデミー会報）180：7461-7465（1983年）に記されている原理

に従った天然ポリペプチドのアミノ酸連鎖と相容性のある配列をもつ、異なる制限部位を端部に備えた化学的に合成したオリゴヌクレオチドの組立て段階、

— こうして得られた核酸を適切なベクター内でクローニングし、適切なプローブとの雑種形成により求める核酸を回収する段階。

国际调查报告

International Application No. PCT/FR 90/00393

1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER	
IPC: C07H 21/04, C12Q 1/70, C12Q 1/68, A61K 39/21, G01N 33/569, A61K 39/42, A61K 31/70, C12N 15/49	
2. FIELD SEARCHED	
IPC ⁵	C12Q, G01N, C12N
3. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category	Relevance to Claim No.
X, Y	EP, A. 0229701 (CETUS CORPORATION) 22 July 1987 see page 11, lines 44-47; page 12, lines 61-64; page 13, lines 1-7, 31-42; page 14, lines 15-18
X	EP, A. 0272098 (CITY OF HOPE NATIONAL MEDICAL CENTER) 22 June 1988 see the whole document
X	EP, A. 0269445 (CETUS CORPORATION) 1 June 1988 see the whole document
P, X	The Lancet, vol. 2, 16 September 1989, The Lancet Ltd. C.R. Horsburgh, Jr. et al.: "Duration of human immunodeficiency virus infection before detection of antibody", pages 637-639. see page 638, left-hand column, last paragraph
4. SUMMARY OF THE INVENTION	
Date of the Actual Commission of the International Search: 26 September 1990 (26.09.90)	
Date of Issuance of the International Search Report: 12 March 1991 (12.03.91)	
International Searching Authority: European Patent Office	

Form PCT/ISA/206 (revised about January 1989)

International Application No. PCT/FR 90/00393

5. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category	Relevance to Claim No.
X	Science, vol. 239, 15 January 1988, C.-Y. Ou et al.: "DNA amplification for direct detection of HIV-1 in DNA of peripheral blood mononuclear cells", pages 295-297. see table 2
X	The Journal of Infectious Diseases, vol. 158, No. 6, December 1988, M. Rayfield et al.: "Mixed human immunodeficiency virus (HIV) infection in an individual: Demonstration of both HIV type 1 and type 2 proviral sequences by using polymerase chain reaction", pages 1170-1176. see table 1
X	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 86, April 1989, D.J. Kemp et al.: "Colorimetric detection of specific DNA segments amplified by polymerase chain reactions", pages 2423-2427. see page 2424, lines 1-23
P, X	Cell, vol. 58, No. 5, 8 September 1989, Cell Press, A. Meyerhans et al.: "Temporal fluctuations in HIV quasispecies in vivo are not reflected by sequential HIV isolations", pages 901-910. see page 908, last paragraph
Y	EP, A. 0269520 (INSTITUT PASTEUR) 1 June 1988 see abstract; claims 1-6
Y	WO, A. 88/05440 (INSTITUT PASTEUR) 28 July 1988 see the whole document
Y	WO, A. 87/07906 (INSTITUT PASTEUR) 30 December 1987 see abstract; claims 1-18
Y	WO, A. 87/07300 (WORCESTER FOUNDATION FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY) 3 December 1987 see abstract

Form PCT/ISA/206 (revised about January 1989)

International Application No. PCT/FR 90/00393

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET	
1. OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE	
2. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING	
See Form PCT/ISA/206 dated 11 January 1991	
3. AS ALL REQUIRED ADDITIONAL SEARCH FEES WERE TIMELY PAID BY THE APPLICANT, THIS INTERNATIONAL SEARCH REPORT CARRIES OF UNSEARCHABLE CLAIMS AT THE INTERNATIONAL APPLICATION	
4. AS ONLY SOME OF THE REQUIRED ADDITIONAL SEARCH FEES WERE TIMELY PAID BY THE APPLICANT, THIS INTERNATIONAL SEARCH REPORT CARRIES ONLY PARTIAL CLAIMS OF THE INTERNATIONAL APPLICATION FOR WHICH FEES WERE PAID, SPECIFICALLY CLAIMS:	
1, 12-26 partially and claim 2	
5. AS ALL CLAIMS WERE SEARCHED WITHOUT EFFORT JUSTIFYING AN ADDITIONAL FEE, THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY HAS NOT MADE PAYMENT OF ANY ADDITIONAL FEE	
6. THE APPLICANT HAS REQUESTED THAT THE PAYMENT OF ADDITIONAL SEARCH FEES BE ACCOMPANIED BY THE PAYMENT OF ADDITIONAL SEARCH FEES	

Form PCT/ISA/206 (revised about January 1989)

国际调查报告

FR 9000393
SA 37940

This report lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file no. 87/11190. The European Patent Office is in no way liable for those particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent documents cited in search report	Publication date	Patent family members	Publication date
EP-A- 0229701	22-07-87	AU-A- 6710987 JP-A- 62217161	16-07-87 24-09-87
EP-A- 0272098	22-06-88	None	
EP-A- 0269445	01-06-88	JP-A- 63294800	01-12-88
EP-A- 0269520	01-06-88	AU-B- 601397 AU-A- 6891187 EP-A, B 0239425 EP-A- 0320495 WO-A- 8704459 QA-A- 8468	13-09-90 14-08-87 30-09-87 14-06-89 30-07-87 29-07-88
WO-A- 8805440	28-07-88	FR-A- 2610632 FR-A, B 2614025 AU-A- 1225088 EP-A- 0283327 JP-T- 1502119 QA-A- 8716 ZA-A- 8800310	12-08-88 21-10-88 10-08-88 21-09-88 27-07-89 31-03-89 22-07-88
WO-A- 8707906	30-12-87	AU-A- 7546887 EP-A- 0253701 JP-T- 63503513	12-01-88 20-01-88 22-12-88
WO-A- 8707300	03-12-87	US-A- 4806463 AU-A- 7487787	21-02-89 22-12-87

For more details about this report, see Official Journal of the European Patent Office, No. 11/82

第1頁の続き

⑤Int. Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号
C 07 K 13/00		7731-4H
C 12 N 15/33		
C 12 Q 1/68	ZNA A	8114-4B
1/70		8114-4B
// C 07 K 99:00		

優先権主張 ⑥1989年9月20日⑥フランス(FR)⑥89/12371

⑦発明者 モンタニエール, リュク フランス国、エフ-92350 ル・プレシーロバンソン、リュ・ド
ウ・マラブリ、21

⑦出願人 インステイチュート・ナシヨナ フランス国、エフ-75654 パリ・セデュ・13、リュ・ドゥ・ト
ル・ドウ・ラ・サンテ・エ・ド ルビヤック、101
ウ・ラ・ルシエルシエ・メデイ
カル

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成10年（1998）1月13日

【公表番号】特表平4-507043

【公表日】平成4年（1992）12月10日

【年通号数】

【出願番号】特願平2-508911

【国際特許分類第6版】

C12N 15/09 ZNA

A61K 39/21 ABA

48/00 ADY

C07H 21/04

C07K 14/155

14/16

C12Q 1/68

1/70

G01N 33/569

【F I】

C12N 15/00 ZNA A 9282-4B

A61K 39/21 ABA 9284-4C

48/00 ADY 9051-4C

C07H 21/04 B 8615-4C

C07K 14/155 9356-4H

14/16 9356-4H

C12Q 1/68 A 7823-4B

1/70 7823-4B

G01N 33/569 H 0276-2J

平成 9 年 8 月 30 日

特許庁長官 荒井 寿丸 殿

1. 事件の表示

平成 02 年特許第 50891 号

2. 修正をする者

事件との関係 特許出願人

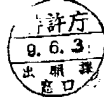
名 称 インスタリキュート・プロセス

名 称 インスタリキュート・ナショナル・ド・ラ・サンチ・
ニ・ド・ラ・サ・ル・シエル・シエ・メ・ディカル

3. 代理人

住 所 〒105 東京都港区虎ノ門1丁目2番12号
S V A X T S ビル

氏 名 弁護士 (7836) 渡 田 啓
TEL(3602)7212



4. 補正命令の付与 有

5. 補正の対象 明細書の発明の具体的な説明及び特許請求の範囲の各欄

6. 補正の内容

- (15) 明細書第 10 頁第 1 行、第 32 頁第 3 行、第 32 頁第 5 行の「中核
(又は核芯) の」を削除する。
(16) 明細書第 7 頁第 10～11 行、第 30 頁第 24 行～第 31 頁第 1 行、第
33 頁第 1～2 行、第 33 頁第 3 行、第 33 頁第 6 行、第 33 頁第 7 行、第 33
頁第 9 行の「中核又は核芯の」を削除する。
(17) 明細書第 5 頁第 12 行、第 5 頁第 17 行、第 6 頁第 15 行、第 36 頁第
11 行の「連鎖」を「鎖」と補正する。

2. 特許請求の範囲の欄

別紙のとおり。

1. 発明の詳細な説明の欄

- (1) 明細書第 7 頁第 5 行、第 11 頁第 10～11 行、同第 20～21 行、第 3
2 頁第 1 行の「について」を「を」に補正する。
(2) 明細書第 12 頁第 7 行の「に対して」を「を」に補正する。
(3) 明細書第 10 頁第 24 行～第 11 頁第 1 行の「に対して」を「を」
に補正する。
(4) 明細書第 32 頁第 7 行の「コード化」を「コード」と補正する。
(5) 明細書第 16 頁第 10 行、第 16 頁第 15 行、第 31 頁第 20 行、第 31
頁第 21 行(二箇所)の「ストランド」を「鎖」と補正する。
(6) 明細書第 1 頁第 7 行(下から 18 行)、第 14 頁第 18 行、第 15 頁第 1
8 行の「鎖配列」を「核酸配列」と補正する。
(7) 明細書第 5 頁第 3 行、第 14 頁第 18 行、第 31 頁第 4 行、第 31 頁第 2
0 行、第 31 頁第 21～22 行、第 32 頁第 4 行の「鎖形成」を「ハイブリダ
イズ」と補正する。
(8) 明細書第 16 頁第 14～15 行の「鎖形成される」を「ハイブリダイズ
する」と補正する。
(9) 明細書第 7 頁第 8 行、第 14 頁第 11 行、第 14 頁第 3 行、第 14 頁第
21 行、第 15 頁第 3 行、第 16 頁第 9 行、第 16 頁第 12 行、第 16 頁第 24
行、第 19 頁第 8 行(二箇所)、第 19 頁第 17 行、第 20 頁第 12 行、第 25
頁第 20 行、第 36 頁第 5 行の「鎖形成」を「ハイブリダイゼーション」と補
正する。
(10) 明細書第 5 頁第 4～5 行の「鎖形成(ハイブリッド形成)」を「ハイ
ブリダイゼーション」と補正する。
(11) 明細書第 31 頁第 9 行「修正」を「改良」と補正する。
(12) 明細書第 16 頁第 9 行、第 33 頁第 15 行、第 33 頁第 22 行の「従っ
た」を「よる」と補正する。
(13) 明細書第 16 頁第 13 行、第 21 頁第 20 行の「重合剤」を「重合化作
用物質」と補正する。
(14) 明細書第 36 頁第 1 行の「相溶性」を「適合性」と補正する。

(別紙)

請求の範囲

1. - HIV-1 Bru、HIV-1 Mal、HIV-1 Eli、
HIV-2 ROD及びSIV MACウイルスの gag、vif及びpol
遺伝子又はHIV-2 ROD及びSIV MACウイルスの nef2、
vif2及びvpx遺伝子又はHIV-1 Bru、HIV-1 Mal及び
HIV-1 Eliウイルスのenv、nef1、vif1及びvpr遺伝子
内に含まれているヌクレオチド配列のうちの1つの中に含まれている配列の中
から選ばれていること、
- 又は(特に最も長いリーダーについて)、HIV-1 Bru、又は
HIV-1 Mal又はHIV-1 Eli又はHIV-2 ROD又は
SIV MACからの前記ヌクレオチド配列のうちの1つを含むか、又は、こ
れらの配列の相補的ヌクレオチド配列を含み、末端3'又は5'の側で当該種
別のヌクレオチド配列から「はみ出す」相補的ヌクレオチドがある場合それら
は必ずしくは「記HIV-1、HIV-2又はSIVMACタイプのウイルス
の完全配列自体の中に相応する末端3'又は5'の手前に置かれているものと
一致すること、
- 又はこのリーダーの配列が上述のヌクレオチド配列の1つと同一でない場合又
はこれらの配列の1つと相補的でない場合、それでもHIV-1 Bru、H
IV-1 Mal、HIV-1 Eliウイルスからの核配列と及び/又は上
述のHIV-2 ROD又はSIV MACウイルスからのヌクレオチド配列
とハイブリダイズする可能性があること、
を特徴とするヌクレオチド配列。

2. N1: TGG CGC CGG AAC AGG GAC

.....T.....

S, 636-653, 655-662, 636-653, 839-876,

834-851

N2: GGC CAG CGG GAA AGA AAA A

.....C.....

... ..A... ..
 S, 851-872, 864-888, 848-872, 1160-1164,
 1124-1148
 MMy3: TGC CCA TAG AAA ATG TTT TA
C... ..T... ..
 AS, 909-841, 816-897, 900-881, 1212-1192,
 1176-1157
 MMy4: TGC ATG GCT GCT TGA TG
A... ..C... ..G... ..
 AS, 1365-1369, 1419-1403, 1385-1369, 1703-1687,
 1667-1651
 MMy4B: GTT TGC ATG GCT GCT TGA TG
A... ..C... ..G... ..
 AS, 1385-1369, 1421-1403, 1388-1369, 1706-1687,
 1670-1651
 MMy4Phis: CAT GAA GCA GGC ATG CAA AG
C... ..G... ..T... ..G... ..
 S, 1369-1388, 1403-1421, 1360-1388, 1687-1706,
 1661-1670
 MMy28: AGG GCT GTT GGA AAT GTG G
G... ..
 S, 2021-2039, 2056-2073, 2024-2042, 2325-2349,
 2299-2318,
 MMy28bis: CCA CAT TTC CAG CAT CCC T
G... ..
C... ..
 AS, 2035-2021, 2073-2055, 2042-2024, 2340-2329,
 2218-2299
 というヌクレオチド鎖を特徴とする、HIV-1 B r u、HIV-1

4460-4471,
 MMy5bis: CCT TTC TGT GGT ACC CAT G
 AS, 4207-4185, 4202-4181, 4171-4150,
 4555-4531, 4471-4450,
 MMy32: TGC AAA GGT GAA GGG GCA GT
A... ..
 S, 4892-5011, 4987-5006, 4950-4975, 5340-5359,
 5256-5275,
 MMy32bis: ACT GGC CTT TTA GGT TTC GA
T... ..
C... ..
 AS, 5011-4992, 5006-4987, 4975-4956,
 5359-5340, 5275-5256
 というヌクレオチド鎖を特徴とする、HIV-1 B r u、HIV-1
 M a l、HIV-1 E l i、HIV-2 R O D及びSIV-MACウイルス
 のp o l遺伝子内に含まれている、請求項1記載の配列。
 5. MMy12: AGA GAC TGT TGC GGC GGC GTG
 S, 9165-9183, 9139-9159,
 MMy12: ATA TAG TTA GAA AAG GAA GAA GG
 S, 9542-9564, 9515-9538,
 MMy13bis: CCT TCT TCC TTT TGT AAG TAT AT
 AS, 9564-9542, 9538-9516,
 MMy14: AGC TGA GAC AGC AGG GAC TTT GCA
 AS, 9956-9933, 9893-9870,
 というヌクレオチド鎖を特徴とする、HIV-2 R O D及びSIV-MACウ
 イルスのn e r 2遺伝子内に含まれている、請求項1記載の配列。
 6. MMy20: TAT GGA GGA GGA AAA GAG ATG GAT AGT
 S, 5424-5450, 5340-5366,
 MMy21: TAT CAC TTA TTT CCC TTG CTT T

M a l、HIV-1 E l i、HIV-2 R O D及びSIV-MACウイルス
 のg a g遺伝子内に含まれている、請求項1記載の配列。
 3. MMy18: GAT AGA TGG AAC AAG CCC CAG
 S, 5590-5618, 5585-5605, 5554-5674,
 6233-6296, 6147-6170,
 MMy19: TGC ATT TCT TGC TGT GGT GTG T
 AS, 5870-5849, 5865-5844, 5834-5813, 6561-6531,
 6454-6431,
 というヌクレオチド鎖を特徴とする、HIV-1 B r u、HIV-1
 M a l、HIV-1 E l i、HIV-2 R O D及びSIV-MACウイルス
 のv p r遺伝子内に含まれている、請求項1記載の配列。
 4. MMy29: TAA AGC CAG GAA TGG ATG GGC CAA
A... ..
 S, 2670-2643, 2615-2638, 2584-2607,
 2971-2994, 2887-3010
 MMy29bis: TIG GGC CAT CCA TTC CTG GCT TTA
T... ..
 AS, 2643-2620, 2638-2615, 2607-2584,
 2994-2971, 3010-2887,
 MMy30: TGG ACT GTC AAT GAC ATA CAG AA
T... ..
 S, 3330-3361, 3334-3356, 3333-3325, 3090-2712,
 3606-3628,
 MMy30bis: TTC TGT ATG TCA TTG ACA GTC CA
T... ..
 AS, 3361-3332, 3356-3334, 3325-3303,
 2712-3690, 3628-3606,
 MMy31: CAT GGC TAC CAG GAC ACA AAG G
 S, 4186-4207, 4181-4202, 4150-4171, 4634-4666,
 S, 5761-5775, 5670-5691,
 MMy21bis: AAA GCA AGG GAA ATA AGT CTT A
 AS, 5775-5754, 5691-5670,
 MMy22: CCC TTG TTC ATC ATG GCA GAA T
 AS, 6082-6061, 5936-5974,
 というヌクレオチド鎖を特徴とする、HIV-2 R O D及びSIV-MACウ
 イルスのv p x遺伝子内に含まれている、請求項1記載の配列。
 7. MMy23: ATG TGA GAT CCG AGG GAG A
 S, 5900-5918, 5813-5831,
 MMy24: CCT GGA GGC GGA GGA GGA GGA
 AS, 6228-6208, 6141-6121,
 というヌクレオチド鎖を特徴とする、HIV-2 R O D及びSIV-MACウ
 イルスのv p x遺伝子内に含まれている、請求項1記載の配列。
 8. MMy5: CCA ATT GCC ATA CAT TAT TGT GGC CC
 S, 6905-6930, 6903-6928, 6860-6885
 MMy5bis: GGG GCA CAA TAA TGT ATG GGA ATT CC
 AS, 6930-6905, 6928-6903, 6895-6860,
 MMy9: AAT GGC AGT CTA GCA GAA GAA GA
 S, 7055-7077, 7053-7073, 7010-7032
 MMy7: ATC CTC AGG AGC CCA CCC AGA AAT T
 S, 7360-7384, 7349-7373, 7308-7330
 MMy7bis: AAT TTC TGG GTC CCC TCC TGA GGA T
 AS, 7384-7360, 7373-7343, 7330-7306
 MMy8: CTG CTT CCT GCT GCT CCG AAG AAC CC
 AS, 7857-7832, 7846-7821, 7800-7775
 MMy8bis: GGC TTC TTG GGA GCA GCA GGA AGC AC
 S, 7832-7857, 7821-7846, 7775-7800,
 MMy9: ATG GGT GGC AAG TGG TCA AAA AGT AG
A... ..

S, 8644-8839, 8836-8861, 8787-8812,
 My9bis: CTA CTT TTT GAC CAC TTG CCA CCC AT
 AS, 8869-8844, 8851-8836, 8812-8787,
 My9a: TAT TAA CAA GAG ATG GTG G
 S, 7629-7647, 7612-7530, 7572-7590,
 My9b: CCA GCA AGA AAA GAA TGA A
 S, 8224-8242, 8213-8231, 8167-8185,
 My9bis: TTC ATT CTT TTC TTG GTG G
 AS, 8242-8224, 8231-8213, 8185-8167,

というヌクレオチド鎖を特徴とする、HIV-1 Brn、HIV-1 Ma1
 及びHIV-1 E11ウイルスのenv遺伝子内に含まれている、請求項1
 記載の配列。

9. My10: AAA AGA AAA GGG GGG ACT GGA
 S, 9116-9136, 9117-9137, 9062-9082,
 My10bis: TCC AGT CCC CCC TTT TCT TTT
 AS, 9136-9116, 9137-9117, 9082-9062,
 My11: AAA CTC CCC ACC GGA AAG TCC G
 AS, 9503-9483, 9505-9484, 9449-9428,

というヌクレオチド鎖を特徴とする、HIV-1 Brn、HIV-1 Ma1
 及びHIV-1 E11ウイルスのnec1遺伝子内に含まれている、請求項1
 記載の配列。

10. My15: GAT CAT GGA AAA GAG ATG CCA CGT CAT
 S, 5073-5099, 5058-5094, 5037-5063,
 My16: CCA GAC CAA CTA ATT CAT CTG TA
 S, 5383-5405, 5378-5403, 5347-5369,
 My16bis: TAC AGA TGA ATT AGT TGG TCT GC
 AS, 5405-5383, 5400-5378, 5369-5347,
 My17: CTT AAC CTC CTC TAA AAG CTC TA
 AS, 5672-5653, 5670-5648, 5639-5617,

れるようなサイクル。

— 生物学的試料内にHIV-1及び/又はHIV-2及び/又はSIVタイプ
 のウイルスのゲノムに属する核酸が場合によって存在することを検出する段
 階。

を含む方法。

13. ウイルスDNAの抽出段階には、

- ポッタスビストン内で熱分解された0.5mlの水の中での細胞沈渣の意図的
 段階。
- いわゆる「往復運動による」細胞の粉砕段階。
- 最終濃度が0.1%になるような、1対100×トリトンの付加段階。
- 100℃で15分〜25分間の熱による変性段階。
- 細胞残渣のみを除去するための短い遠心分離段階。
- 無水エタノール2.5体積と最終体積の10%の3モルの硝酸ナトリウムの
 付加による−20℃での一晩中のDNAの沈殿段階。

が含まれることを特徴とする、請求項12記載の方法。

14. ウイルスのRNAの逆転写段階には、

- 水中に再懸濁された抽出RNA10μgを最終体積40μl内で各々
 0.8μMの濃度でリグド対の存在する中に置き、この全体を10分間
 100℃で変性し次に氷水の中に沈める段階。
- 5μlの「10×バッファ」の懸濁液(1/10⁴に希釈されたタギトリ
 ス-HCl, pH=8.9; 50mM; (NH₄)₂SO₄; 15mM; MgCl₂; :
 5mM; β-メルカプトエタノール; 10mM; ゼラチン; 0.25mg/ml)を含
 む) + 1単位の逆トランスクリプターゼ + 1単位のTaq-ポリメラーゼ + 各
 2.5mMの4つのdNTPの混合物1μl + Q. S. P. 水10μlの混合物
 10μl)を再び加え(なおDNAの製造は13分間42℃で逆トランスクリ
 プターゼの作用により行なわれる)、次に3分間55℃に加熱して逆トランス
 クリプターゼを破壊する段階。

が含まれることを特徴とする、請求項13記載の方法。

15. 変性段階が、請求項1〜11のいずれか1項記載のリグド対の存在する

というヌクレオチド鎖を特徴とする、HIV-1 Brn、HIV-1 Ma1
 及びHIV-1 E11ウイルスのvif1遺伝子内に含まれている、請求項1
 記載の配列。

11. My25: CTA AGT AGT ACA TCT AAT GCA ACC T
 S, 6081-6105, 6076-6100, 6045-6069,
 My26: AGG ATA AGA CAG TGG CCA TGA GAG
 S, 6240-6263, 6238-6261, 6207-6230,
 My27: ACT ACA GAT CAT CAA TAT CCC AA
 AS, 6343-6321, 6338-6316, 6307-6285,

というヌクレオチド鎖を特徴とする、HIV-1 Brn、HIV-1
 Ma1、HIV-1 E11、HIV-2 HCR及びSIV-MACウイルス
 のvpu遺伝子内に含まれている、請求項1記載の配列。

12. 生物学的試料に基づいて行なわれるHIV-1及び/又はHIV-2及
 ひ/又はSIVタイプのウイルスの核酸配列の遺伝子発現方法において、上とし
 て、

1. 上述の生物学的試料の中に場合によって存在するHIV-1、HIV-2又
 はSIVタイプのウイルスのゲノムに属する検出すべき核酸の抽出段階、及び
 場合によってはこの核酸がRNAの形をしている場合のこの核酸の逆トランス
 クリプターゼ(逆転写酵素)を用いた処理段階。

— 一本鎖核酸の形成を導く、検出すべき二本鎖核酸の変性の段階。

— 少なくとも1つの上配リグド対と上鎖鎖を複結させることによる請求項1〜
 11のいずれか1項記載の少なくとも1つのリグドと、上鎖鎖変性段階の際に得
 られた核酸鎖の各々のハイブリダイゼーションの段階。

— 1つのDNAポリメラーゼと異なる4つのヌクレオシド三リン酸
 (dNTP)の存在する中でリグドが上でハイブリダイズするような鎖と相補
 性をもつDNAを、これらのリグドから形成し、かくして先行する変性段階に
 比べさらに多くの二本鎖核酸の形成がもたらされる段階
 を含む、かつ場合によって生物学的試料の中にその検出を可能にするだけ充分
 な割合で存在する検出すべき前記核酸配列を得るため規定の回数だけくり返さ

中行なわれることを特徴とする、請求項12〜14のいずれか1項記載の方法。

16. — ハイブリダイゼーション: 変性-再結合の第1段階のためプライ
 マー(各プライマー40μモルの溶液1μl)をDNAマトリクス(100〜
 300ng)が存在する中に置く: 10分間100℃で加熱しこのDNA-マト
 リクスとプライマの混合物を含む試管を氷を冷たい水中に沈める。これら
 のプライマは、0.8μMという次に続く増幅段階における最終濃度で使用さ
 れなくてはならない。

— 増幅: 前記試管内に、各々最終溶液(50μl)中で0.5μモルで使用され
 る4つのdNTPと、50μlの反応緩衝液に対し1単位のTaq-ポリメラー
 ゼを添加する: この段階は、「10×バッファ」の名で呼ばれる請求項14に
 組成が示されている増幅緩衝液の中で行なわれる。

という条件の下で実施されることを特徴とする、請求項15記載の方法。

17. HIV-1及び/又はHIV-2タイプのウイルスによるヒトの感染又
 は3つのウイルス(HIV-1、HIV-2、SIV)の1つ以上による動物
 の感染の生体外診断である、請求項12〜16のいずれか1項記載の方法。

18. HIV又はSIVタイプのウイルスのゲノムのヌクレオチド配列の増幅
 とそれに続く、請求項1〜11のいずれか1項に記載のヌクレオチドリーダから
 これらの増幅された配列をタンパク質に翻訳する作業用の、請求項12〜16
 のいずれか1項記載の方法。

19. 請求項1〜11のいずれか1項記載の核酸配列の翻訳生成物及び/又は
 請求項12〜16のいずれか1項記載の方法により増幅されたヌクレオチド配列
 の翻訳生成物を含む免疫原化合物。

20. My4Rbis-My28bis、My26-My8bis、My8bis-My29、My8bis-
 My9bis、My25-My27、My26-My27、My23-My29bis、My29-My30bis、
 My30-My31bis、My31-My32bis、といった、請求項12〜16のいずれか1項
 記載の方法用のオリゴヌクレオチドリーダ対。

21. — 請求項1〜11又は20のいずれか1項記載の、少なくとも1対の
 オリゴヌクレオチドリーダ対。

- 特にDNAポリメラーゼと4つの異なる三リン酸ヌクレオチドの増幅酵素サイクルの実施に適用した試薬。

- 請求項14に記載されているような「10×バッファ」緩衝液。

- 検出すべき増幅された核酸配列とハイブリダイスすることのできる、標識づけ可能なプローブ。

を含む、請求項12～16のいずれか1項記載の方法の使用のためのキット。

22. 薬学的に受容可能な賦形剤と結びつけた状態で請求項1～11のいずれか1項記載のアナセンヌヌクレオチド配列を少なくとも1つ含む、ウイルス性疾患特にエイズの治療のための組成物。

23. 請求項1～11のいずれか1項記載の核酸配列の複製生成物及び／又は請求項12～16のいずれか1項記載の方法により増幅されたヌクレオチド配列の調製生成物と免疫反応を起こし得る抗体。

24. 請求項23記載の抗体と研究対象の患者から採取した生物学的試料（特に血清）との接触、及び場合によってこの生物学的試料の中に存在するHIV又はSIVタイプのウイルスの抗原と前記抗体の間で形成された免疫学的複合体の検出を含む、3つのウイルス（HIV-1、HIV-2、SIV）のうちの少なくとも1つによる動物の感染又はHIV-1及び／又はHIV-2タイプのウイルスによるヒトの感染を「生体外」で診断する方法。

25. 請求項23記載の抗体及び場合によってはこれらの抗体とHIV及び／又はSIVウイルスの抗原の間で起こった免疫学的反応を実証するのに適用した試薬を含む、請求項24記載の方法の使用のためのキット。

26. 1/10に希釈されたとき、

- トリス-HCl、pH 8.9：50mM；

- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ：15mM

- MgCl_2 ：5mM

- β -メルカプトエタノール：10mM

- ゼラチン：0.25mg/ml

を含むことを特徴とする、請求項12記載の方法のハイブリダイゼーション段階又は請求項14記載の方法のウイルスRNAの逆転写段階において使用可能な緩

衝液溶液（「10×バッファ」）。